

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE ET ANTIGERMINATIVE
DES SURNAGANT DE BACTERIES RHIZOSPHERIQUES**

S. MEZAACHE-AICHOURE, N. HAICHOURE, S. CHEBEL, A. BOUABDALLAH ET M.M. ZERROUG
Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Département de microbiologie, Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie.
Corresponding authors E-mail: mezaic2002@yahoo.fr; med.zerroug@gmail.com

RÉSUMÉ

L'utilisation de moyens de contrôle biologique pour les maladies des plantes représente une bonne alternative au contrôle chimique. L'objet de notre travail est d'évaluer l'effet de filtrats de bactéries sur la croissance fongique et la germination de spores des pathogènes telluriques *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var *coeruleum* (Fsc) et *Phytophthora infestans* (Pi) responsable du Bayoud, de la pourriture sèche et du mildiou. Les filtrats bactériens de 15 souches ont été obtenus par filtration d'une suspension de spores incubée 72h avec agitation. Les résultats montrent que ces extraits bactériens inhibent à la fois la croissance mycélienne (la surface d'inhibition varie de 0 à 18 mm) et la germination des spores (certains filtrats ont présenté une inhibition totale de 100%)

Mots-clés: Métabolites secondaires, croissance fongique, inhibition, champignons telluriques phytopathogènes, germination des spores.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTI-FUNGAL AND ANTI-GERMINATIVE ACTIVITIES OF RHIZOSPHERIC BACTERIAL SUPERNATANTS

The use of biological control of plant diseases represented a good alternative for the chemical control. The aim of our work is to evaluate the effect of bacterial filtrates on the fungal growth and fungal spores germination of telluric phytopathogenic fungi: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc) and *Phytophthora infestans* (Pi), causing Bayoud, dry rot and mildew diseases respectively. Bacterial filtrates of 15 strains were obtained by filtration of a bacterial suspension incubated for 72h with stirring. The results showed that these bacterial extracts inhibit both fungal growth (the inhibition zones vary from 0 to 18mm) and spore germination (some filtrates gave a total inhibition of 100%).

Keywords: bacterial secondary metabolites, fungal growth, inhibition, phytopathogenic soil fungi, spores germination.

INTRODUCTION

Durant le dernier siècle, une somme considérable de recherches a maintes fois démontré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes. Les interactions plante-microorganismes sont complexes et celles menant au biocontrôle peuvent inclure l'antibiose, la compétition, l'induction des mécanismes de défense de la plante et la prédation (Benizri, 2001 *In* Allaire, 2005).

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas* et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* et *Trichoderma*. La majorité des études montrent que de 1 à 10 % des isolats du sol peuvent avoir un certain pouvoir antagoniste *in vitro*, mais de ce nombre, très peu a la capacité de supprimer les agents phythopathogènes dans divers sols et conditions de croissance et encore un plus petit nombre est capable d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

L'objectif de ce travail est de tester l'activité antifongique et anti-germinative d'extraits bactériens déjà caractérisé pour leurs capacités antagonistes vis-à-vis de champignons telluriques : *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Phytophthora infestans*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATERIELS BIOLOGIQUES :

Champignons phythopathogènes

Les souches testées sont : *Phytophthora infestans* (Pr Larous, LMA, Département de microbiologie, Université Sétif-1, *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (INRAA, Alger) et *Fusarium solani* var. *Coeruleum* (Institut Pasteur de Paris, France).

Souches bactériennes de référence

Les souches bactériennes de référence testées sont *Pseudomonas protogene* CHAO, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 (Pr Haas, Lausanne, Suisse) et la souche 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* (Dr. Mezaache-aichour, LMA Département de microbiologie, Université Sétif-1-).

Souches bactériennes testées

Les bactéries utilisées pour les tests d'inhibition de la germination des spores ont été isolées précédemment par Belatrous et Sayah (2011) et identifiées par Mansouri et Remadna (2013) : Xi29, Xi48, Xi49, Xi47, B5, B21, Xi35', Xi29', Xi37', Xi30, Xi12, Xi1.

Préparation des filtrats bactériens

Les souches bactériennes de référence ainsi que les souches testées préalablement ravivées sur bouillon nutritif (BN) sont cultivées dans 25 ml de bouillon nutritif à l'extrait de levure (NBY) pendant 72h, sous agitation permanente à température ambiante. La densité optique (DO) est mesuré à 625 nm afin de connaître la charge microbienne productrice des substances anti-germinatives.

Filtration et récupération des filtrats bactériens :

Les cultures bactériennes sont centrifugées pendant 20mn à 5600 rpm, filtrées à travers des membranes de 0.45 µm de diamètre (THOMAPOR® Membranfilter), les filtrats sont récupérés dans des flacons stériles et emmagasinés à 4 °C en vue d'être utilisés.

Récupération et dénombrement des spores fongiques

Des disques fongiques découpés dans des cultures fongiques âgées de plus d'un mois sont homogénéisés par vortex dans 3 ml d'eau distillée stérile, le dénombrement des spores est effectué sur cellule de Malassez (Ebstrup *et al.*, 2005).

Inhibition de la germination :

On dispose dans une série des microtubes un volume de 1ml de suspension sporale de concentration déterminée (Ebstrup *et al.*, 2005), et à l'aide d'une micropipette on ajoute un volume de 20µl des filtrats bactériens à étudier en plus des filtrats des souches de référence. Les tubes sont préparés en triplicatas, et incubés pendant 24h à température ambiante. Le pourcentage des spores non germées est calculé selon la formule suivante :

$$\%SNG = \frac{SNG}{SG+SNG} \times 100$$

% SNG : pourcentage des spores non germées, SG : nombre des spores germées, SNG : nombre des spores non germées.

Inhibition de la croissance mycélienne

Un triplicata de disques imprégnés de 20 µl d'extraits bactérien est préparé pour chacune des bactéries à tester. Après séchage les disques sont réservés en vue d'être utilisés.

D'autre part, une série de boites contenant du pomme de terre dextrose agar (PDA) est préparée pour chaque champignon à tester (Foa, Fsc et Pi). 16 boites sontensemencées par inondation en déposant un volume de 0.1 ml de suspension sporale déterminée. 15 boites recevront respectivement trois disques de chaque extrait bactérien, en plus d'un disque imprégné de bouillon NBY (témoin négatif), la seizième boite ne recevra aucun disque et constituera le témoin négatif (champignon sans aucun traitement).

Les boites sont alors incubées à l'obscurité à température ambiante pendant quatre jours, les zones d'inhibition sont alors mesurées pour déterminer les moyennes d'inhibition.

RESULTATS

INHIBITION DE LA GERMINATION

Après 24h d'incubation on a pu évaluer une inhibition significative de la germination des spores de *Fusarium solani var. coeruleum* par les extraits bactériens. En effet, cette inhibition a varié entre 41.9% pour l'isolat XI37', et 100% pour les isolats XI1, XI35'et Xi47. Alors que pour les souches de référence CHA0, 30 -84 et Souche 2 et on a obtenu respectivement 66.66, 75 et 100% (Tableau I).

Le pourcentage des spores non germées pour *Phytophthora infestans* a varié entre 15.47% pour l'isolat XI30 et 100% pour le témoin. Alors que pour les souches de référence et la Souche 2 et 30-84 et CHA0 on a obtenu respectivement 33.33%, 33.33% et 60% (Tableau I).

Le pourcentage des spores non germées pour *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* a varié entre 0% pour l'isolat XI30, B5 et 100% pour Xi49, Xi29', Xi35', Xi37' ; B21. Alors que pour les souches de référence 30-84, CHA0 et 2 on a obtenu respectivement 100,100 et 100%, (Tableau I).

Tableau I. Pourcentage d'inhibition de la germination des spores
Inhibition pourcentage of spores germination

Extrait bactérien	Pourcentage des spores non germées		
	Fsc	Pi	Foa
2	100.00	33.33	100.00
Xi48	50.00	26.78	66.66
Xi47	100.00	35.41	60.00
Xi37'	41.90	58.33	100.00
Xi12	50.00	46.20	50.00
Xi49	76.38	33.33	100
B5	66.66	29.28	00.00
B21	50.00	50.00	100.00
Xi29' inhibitrice	66.66	73.3	100.00
30-48	75.00	33.33	100.00
Xi29	66.66	23.61	81.66
Xi35'	100.00	16.66	100.00
Xi1	100.00	50.00	50.00
Xi30	50.00	15.47	00.00
CHAO	66.66	60.00	100.00
Témoin	55.04	100.00	84.21

INHIBITION DE LA CROISSANCE FONGIQUE

L'effet inhibiteur des filtrats bactériens sur la croissance des 3 champignons varie beaucoup d'un filtrat à un autre, et même l'effet d'un même filtrat varie avec les champignons. Certains ont montré des zones d'inhibition bien nettes et claires, d'autres ont montré des zones intermédiaires, et enfin ceux qui n'ont montré aucun effet.

Concernant le *Fusarium solani* var. *coeruleum*, après 24h d'incubation, on a pu remarquer que la plus importante zone d'inhibition a été obtenue avec le filtrat de la souche Xi30 avec un diamètre de 16,5mm (Tableau II) alors que les filtrats des souches de référence 2, 30-84 n'ont aucun effet sur ce champignons (Tableau II).

Pour *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, deux filtrats ont montré une zone d'inhibition nette, il s'agit de ceux des isolats Xi29'inh et B5 avec respectivement 11,33 et 10mm. Alors, que les autres filtrats ont montré un effet moins important avec des zones nettes variant entre 7 et 8 mm (Tableau II). Concernant ceux des souches de référence CHAO, 2 et la souche 30-84, ils ont montré des zones d'inhibition de 8.33, 8 et 7 mm respectivement (Tableau II).

Concernant *Phytophthora infestans*, les filtrats des trois souches : Xi48 et Xi12 ont montré des zones d'inhibition de 8.33 et 18.66mm respectivement, alors que les autres souches ainsi que les souches de référence n'ont montré aucune zone d'inhibition (Tableau II).

Tableau II. Inhibition de la croissance mycélienne
Inhibition of mycelium growth

Filtrat bactérien	Diamètre inhibition (mm)		
	Fsc	Foa	Pi
XI47	00.00	07.00	00.00
XI29	00.00	7.00	00.00
B5	00.00	10.00	00.00
XI12	00.00	07.00	18.66
XI29'	00.00	11.33	00.00
XI48	8.33	07.66	08.33
XI35'	8.33	07.33	00.00
CHAO	00.00	08.66	00.00
2	00.00	08.00	00.00
XI37'	07.00	08.00	00.00
30-48	00.00	07.00	00.00
B21	00.00	08.00	00.00
XI30	16.50	08.00	00.00
XI49	13.66	07.00	00.00
XI1	10.50	07.00	00.00
Fongicides			
Curtin	19.50	9	15.33
Vamcotop	09.00	09.5	10.00
Kazi	17.00	9	10.50

DISCUSSION

Beaucoup d'antagonismes existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. Le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre ; les résultats au champ n'ont pas toujours un succès. Les problèmes majeurs sont dus au fait que les microorganismes introduits échouent généralement dans leur compétition avec la microflore existante (Nasraoui, 2006).

Dans cette étude les isolats les plus efficaces sur l'inhibition de la germination des spores fongiques sont : les isolats XI29' inhibitrice (*Pseudomonas* sp.), XI35', XI37' et XI49 (bacilles à Gram ^{+ve}) en plus des souches de référence testée. Cette activité antifongique a été attribuée aux lipopeptides extracellulaires identifiés comme des fengycines dans le cas des *Bacillus* (Chan *et al.*, 2009). Par contre dans le cas des *Pseudomonas*, Lim *et al.* (1991) ont démontré que le filtrat de *Pseudomonas stutzeri* Ypl-1 produit des enzymes lytiques telles que : la chitinase et la laminarinase extracellulaires. Ces enzymes lytiques empêchent la croissance mycélienne plutôt que la germination des spores, mais causent également la lyse des mycéliums et des tubes germinatifs chez *F. solani*.

En ce qui concerne l'inhibition de la croissance mycélienne, les bactéries appartenant au genre des *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* possèdent la capacité de sécréter des substances tel que les phenazines, phloroglucinols, pyoluteorines, pyrrolnotrines, lipopeptides cycliques et le cyanure d'hydrogène qui inhibent la croissance de certaines espèces fongique (Haas and Défago. 2005; Schoutenet *al.*, 2008).

CONCLUSION

La protection des cultures contre les phytopathogènes est un enjeu majeur en agriculture. La lutte chimique est largement employée, mais elle n'est pas toujours efficace et peut conduire à des contaminations des aliments et de l'environnement. L'efficacité des bactéries isolées laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies fongiques du palmier dattier et de la pomme de terre.

L'implication du mécanisme de la compétition par des bactéries du biocontrôle, capable de produire des substances antagonistes qui inhibent la germination des spores du champignon phytopathogène. Ceci permet de retarder les infections de la pomme en post-récolte et du palmier dattier par le pathogène. Dans ce cas, la compétition par l'excrétion des substances peut être efficace comme un mode d'action unique, ou en contribuant à affaiblir le pathogène et le prédisposer à d'autres modes d'actions qui demandent plus d'investigations.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour son soutien financier dans le cadre des programmes de recherche "CNEPRU N° F01220100022 et PNR 1 / u19 / 332".

BIBLIOGRAPHIE

- Belatrous, Z. 2011. Contribution à l'étude des sols suppressifs de la région de Ain oulmane. UFA Sétif Mémoire de Master 40 p.
- Sayah, N. 2011. Contribution à l'étude des sols suppressifs de la région de Ain Azel. UFA SETIF mémoire DE master 45 P.
- Allaire M. 2005. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. *Mémoire de maitres es science (m. sc.) université laval : p5, 2005.*
- Ebstrup, T. Saalbach, G. and Egsgaard, H. 2005. A proteomics study of *in vitro* cyts germination and appressoria formation in *Phytophthora infestans*. *Proteomics* 5: 2839-2848.
- Haas, D. and Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- Lim, H-S. Kim, Y-S and Kim S-D. 1991 *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ microbiol* 57(2): 510-516.
- Ramadna, H. and Mansouri, S. 2013 Identification de bactéries isolées de la rhizosphère. UFA Mémoire de Master pp 25-35.
- McSpadden Gardener, B.B. and Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA Online. *Plant Health Progress* 10:1-18.
- Nasraoui, B. 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. *Centre de publication Universitaires, Tunisie* p : 330.
- Schouten, A. Maksimova, O. Cuesta-Arenas, Y. van den Berg, G. and Raaijmakers J.M. 2008. Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defense of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol* 10:145-157.